

培養葯内でのムラサキツユクサの花粉発育について

中沢 潤*

On the pollen development in excised anthers of *Tradescantia*

Zyun NAKAZAWA *

緒 言

人工培養による葯内での花粉発育の研究は、今までに *Lilium longiflorum*¹⁾, *Tradescantia paludosa*²⁶⁾³¹⁾³²⁾, *Secale cereale*¹²⁾, *Trillium erectum*³⁾²⁵⁾, *Allium cepa*²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾, *Rhoeo discolor*²⁹⁾ などで試みられているが、還元分裂期から成熟花粉に至るまで引き続いて正常に花粉が発育した例は未だ報告されていない。最近では葯培養による半数体育成の興味ある報告に多くの関心が集められているが¹⁰⁾、花粉の形成・発育の細胞学的、生理学的過程を追求するためにも、培地上で花粉の全発育過程を一貫して追跡できるようになることが望まれている。

今回の実験の当初の目的はこのような研究に適した培地を見出すことにあったが、所期の目的を達することはできなかった。しかし、この研究過程で培養葯内の花粉発育現象について2.3の興味ある事実がみられたので、それらについて報告する。

材料および方法

本実験は、本学構内に栽培している *Tradescantia reflexa* Raf. ($2n=24$) を用いて、1956～1960年に行なわれた。葯培養の方法はおもに Taylor²⁶⁾ によった。即ち、葯を2～3分間、2～5%過塩素酸ソーダ液で処理し、蒸留水で洗った後、殺菌灯下で葯をとり出し、そのうちの1個を発育時期の同定に用い、残りの5個をペトリ皿中の寒天培地上におき、23～25℃で2～7日間培養したのち、それらの発育状態を酢酸カーミンによって調べた。培養に用いた葯の総数は、還元分裂期からのもの1,286個、4分子または小孢子期からのもの2,289個、計3,525個であった。なお、花粉の

発育段階の表示は中沢¹⁷⁾¹⁸⁾ に従ったが、その概要は次の通りである。

P₁……4分子直後の小孢子期、P₂……小孢子初期(核、中央)、P₃……小孢子前中期(核、偏在、橢円形)、P₄……小孢子中後期(核、偏在、用形)、P₅……小孢子後期(核、中央へ移動)、P₆……小孢子核分裂期、P₇……2核未分化期、P₈……生殖細胞核分化初期、P₉……生殖細胞核発育期、P₁₀……成熟花粉期。

培地には Taylor²⁶⁾ の基本培地にグリシン、インドール酢酸、しょ糖を加えたものを標準培地としたが、それに数種のアミノ酸、RNA、DNA およびそれらの加水分解物、カイネチンのほか、酵母、麦芽、ムラサキツユクサの根端、乾燥ココナツミルクのそれぞれの水抽出液を加えたものなど合計43種類のものを用い、pH=6.5～6.8に調整した。これらの培地のおもなものを第1表に示す。

結 果

まず、各種培地上で葯内の花粉がどの程度発育することができたかを、第2,3表に示す。

第2表は還元分裂の各期から培養を始めた葯が到達した発育段階、およびその個数であり、第3表は4分子期以後から培養を始めたものである。これらによると還元分裂の接合期またはそれ以前から培養した葯のうち発育が進行したものの比率(以下生存率という)は13.1～16.5%にすぎないが、太糸期またはそれ以後からのものの生存率は34.0～59.8%となり、培養された葯の1/3～1/2が発育を続けることができることを示している。しかしながら、第1分裂前期から培養されたものは、その大部分は4分子期で発育を停止し、P₁にまで進むものは全体の1.75%にすぎない。またこの

* 弘前大学教養部生物学研究室

Table 1. Nutrient media used

Names of media	Elements contained	Names of media	Elements contained
SM	Taylor s basic medium+2% Sucrose +3ppm glycine +1ppm IAA	SMcAA R-50	SMcAA+RNA 50ppm
SMc	Taylor s basic medium+10% sucrose +100ppm glycine +1ppm IAA	Rha	SM+RNA acid hydrolysate 120ppm
YE	SM+yeast extract	Rhb	SM+RNA alkali hydrolysate 120ppm
RE	SM+ <i>Tradescantia</i> root extract	D-25	SM+DNA 25ppm
ME	SM+malt extract	D-50	SM+DNA 50ppm
GT	SM+ glutamic acid 100ppm+ tryptophan 100ppm	D-100	SM+DNA 100ppm
AP	SM+ alanine 500ppm+ proline 500ppm	DR-50	SM+DNA 50ppm+RNA 50ppm
R-1	SM+RNA 1ppm	Dha	SM+DNA acid hydrolysate 50ppm
R-25	SM+RNA 25ppm	Dhb	SM+DNA alkali hydrolysate 50ppm
R-50	SM+RNA 50ppm	AU	SM+adenine 10ppm+uridine 10ppm
R-100	SM+RNA 100ppm	K-1	SM+kinetin 1ppm
GTR-10	GT+RNA 10ppm	K-O.1	SM+kinetin 0.1ppm
GTR-100	GT+RNA 100ppm	K-O.01	SM+kinetin 0.01ppm
GTR-1000	GT+RNA 1000ppm	KR-1	K-O.1+RNA 1ppm
SMcR-50	SMc+RNA 50ppm	KR-50	K-O.1+RNA 50ppm
SMcAA	SMC+aspartic acid 100ppm+glutamic acid 100ppm+alanine 100ppm+proline 50ppm+cystein 50ppm	CE	dehydrated coconut milk extract
		SMC	SM+CE

ようにして生じた小胞子は細胞壁の発育が不完全なものが多い。これに反して、第1分裂中期から培養された葯は、発育の進行した葯の半数が4分子期以後の小胞子の段階にまで進む。4分子期またはそれ以後の小胞子期から培養を始めたものでは、P₃~₄頃までは比較的容易に発育が進むが、P₄~₅付近に発育の1つの障壁(critical stage)が存在するように思われる。即ち、4分子期またはP₁~P₂~₃から培養された葯の生存率が平均35.6%であるの

Table 2. Pollen development in anthers cultured from meiotic stages

Starting stages	Preleptotene	Leptotene	Zygotene	Pachytene	Diplo- tene	Diaki- nesis	Meta- phase	Anaphase I~ Telophase II
Arrival stages								
Pachy~ Diplotene	13	6	3	—	—	—	—	—
Diakinesis	1	4	0	4	9	—	—	—
Metaphase I	9	3	2	3	11	9	—	—
Anaphase I~ Telophase II	3	0	0	8	6	1	3	—
Tetrad	3	8	9	42	47	49	45	36
R	1	3		5	2	5	9	5
P ₂ ~ ₃				1			23	31
P ₃ ~ ₄							2	4
P ₄ ~ ₅							2	
P ₅ ~ ₆							2	
Total developed	30	24	14	63	75	64	86	76
Total cultured	218	140	85	152	221	156	187	127
Survival (%)	13.8	13.1	16.5	41.5	33.9	41.0	46.0	59.8

べて、 $P_{3-4} \sim P_{4-5}$ から培養された薬の生存率は平均18.6%に低下しており、4分子期またはその直後から P_6 にまで進んだものは発育個体の8.5%にすぎない。また、 P_{2-3} から培養した薬で発育が進んだものの67%が P_{4-5} で発育が停止しそのまま退化する。同様に小孢子核分裂後 P_{7-8} 付近にもcritical stageがあることは、 $P_6 \sim P_7$ から培養した薬の生存率は更に10.2%に低下することからも推定される。

このように培養薬中での花粉の発育過程には、接合期～太糸期、4分子期～ P_1 、 P_{4-5} 、 P_{7-8} の4つのcritical stagesがあると考えられるが、これらの時期をのりこえて発育することができた薬数、培養に用いた薬の総数に対するその割合、およびそれらの培地の種類を第4表に示す。これによると、一般にグルタミン酸・トリプトファン含有培地、RNA含有培地がよく、特にグルタミン酸・トリプトファン・RNA混

Table 3. Pollen development in anthers cultured from microspore stages

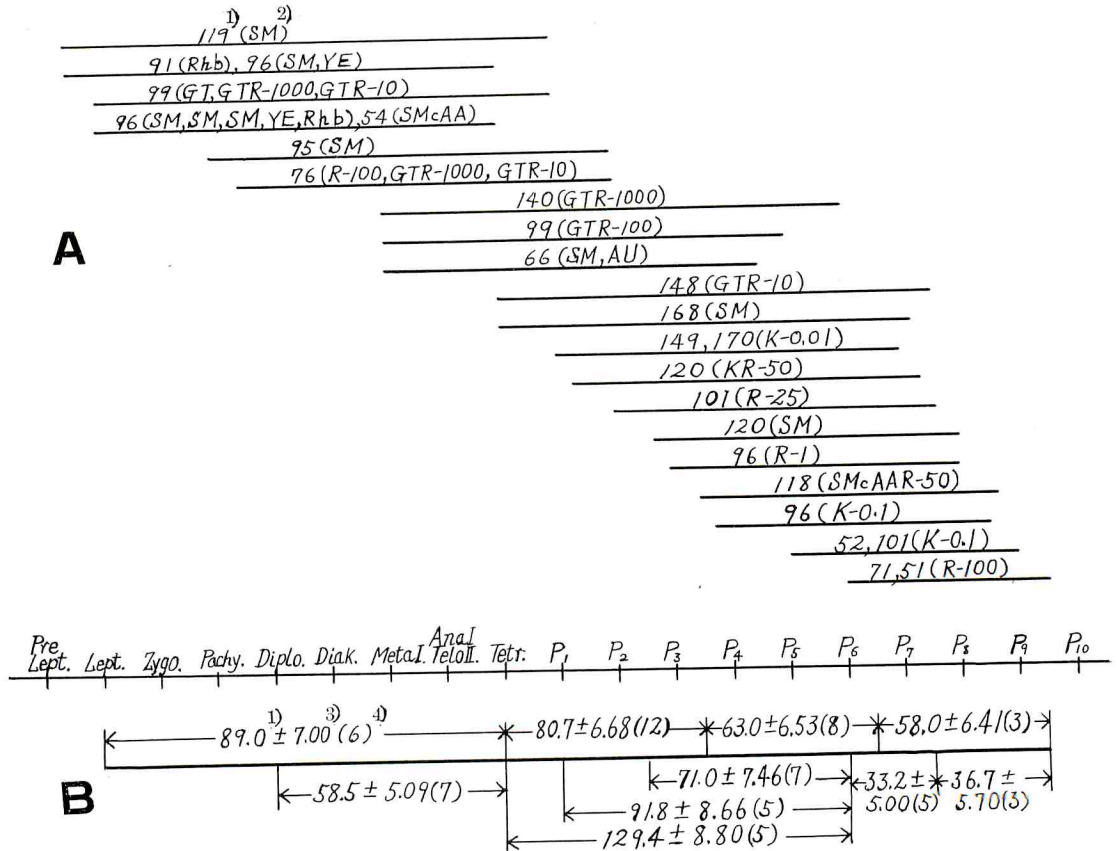
Starting stages Arrival stages	Tetrad	P ₁	P ₂₋₃	P ₃₋₄	P ₄₋₅	P ₅₋₇	P ₇₋₈
	P ₁	13	—	—	—	—	—
P ₂₋₃	67	38	—	—	—	—	—
P ₃₋₄	67	25	54	—	—	—	—
P ₄₋₅	11	16	65	9	—	—	—
P ₅₋₇	7	10	28	13	20	—	—
P ₇₋₈	2	3	31	29	38	19	—
P ₈₋₉				3	2	4	7
P ₉₋₁₀						5	7
Total developed	167	92	178	54	55	28	14
Total cultured	359	299	568	300	286	290	137
Survival	46.5	30.8	31.4	18.0	19.2	9.7	10.2

Table 4. Anthers developing over the critical stages

Media	Duration of development	Before zygotene ~after meta. I	Before P ₁ ~after P ₅	Before P ₆ ~after P ₈	Total developed (D)	Total cultured (T)	D/T x100 (%)
SM		12	3	3	18	918	1.97
SMc		1		2	3	80	3.75
YE		2			2	59	3.39
RE		2			2	56	3.57
GT		4	4		8	136	5.88
R-1		1	2	1	4	95	4.21
R-25			1	4	5	71	7.04
R-50			1	1	2	121	1.65
R-100		2	1	3	6	157	3.82
GTR-10		3	1		4	60	6.67
GTR-100			5		5	80	6.25
GTR-1000		2	6		9	80	11.25
SMcR-50		1			3	80	3.75
Rha		1	1		2	135	1.48
Rhb		4			4	135	2.96
SMcAA		1			1	80	1.25
SMcAAR-50			1	1	2	80	2.50
D-25		1			1	75	1.33
D-50			1	1	2	100	2.00
D-100		1			1	75	1.33
K-1		1	2		3	89	3.37
K-0.1		1	4	4	9	184	4.95
K-0.01			3		3	89	3.37
KR-1			1		1	95	1.05
KR-50			4		4	95	4.21
CE			2		2	70	2.86
AU		1			1	112	0.89

合培地が最も好結果を示している。またカイネチン含有培地も特に小孢子期の発育には効果的であるが、DNAまたはその分解物はあまり効果が認められなかった。これらのうち比較的良好的な発育がみられた若干例について、その培地の種類および発育に要した時間を第1図Aに示す。即ち細糸期から P_1 まで進んだもの、第1分裂中期から $P_5 \sim P_6$ まで進んだもの、および4分子期から P_7 まで進んだものがそれぞれ2例ずつあり、これらの培地の大部分はRNAを含む。発育経過時間は培養条件および個体差によってかなり変動があるが、今回得

Fig. 1, A) Developmental processes of excised anthers progressing favorably. B) Mean values of the developmental duration measured on culture media. 1) duration (HR.), 2) culture media, 3) probable error, 4) number of individuals.



られた培地上での発育時間の平均値を第1図Bに示す。これによると、還元分裂（細糸期～4分子期）は約90時間、小胞子期（4分子期～P₆）は約130時間、2細胞花粉期は約70時間かかるものと思われる。これらは植物体上にある場合より幾分長いようであるが、ほぼ同様な発育過程をたどっているものとみなしてよいであろう。

最後に培養中にみられた2,3の異常現象について述べる。第1に培養薬中では発育の同調性が乱される。例えば4分子期から118時間培養した薬内に4分子状態のものからP₄₋₅のものまでが同一薬内に混在しているのがみられた（第2図）。第2に長形細胞がP₄～

P₆期の薬内に現われ（第3図）、中でもP₁より140時間培養した薬内に3核性の巨大細胞も見出された（第4図）。第3にP₄₋₅にある小胞子細胞で花粉管の発芽しているのがみられたが（第5図）、これは花粉管発芽は必ずしも2核分化後でなくても可能であることを示して興味のあるものである。第4に、特に著しい異常として、小胞子分離直後の時期にある薬内に prochromosome 様の核をもった細胞（第6図）または還元第1中期類似のもの（第7図）がしばしばみられたことで、これらはその細胞壁の状態から小胞子細胞であるとみなされるものである。

Figs. 2-7. Abnormal phenomena of the pollen development in cultured anthers. 2. Asynchronous development of microspores in an anther, cultured from tetrad stage for 118 hrs. on RE medium. 3. 2-nucleate long cells, cultured from tetrad stage for 163 hrs. on SM medium. 4. 3-nucleate giant cell, cultured from P₁ stage for 145 hrs. on SM medium. 5. pollen tube germination of microspores in anther, cultured from tetrad stage for 118 hrs. on RE medium. 6. Prochromosome-like nucleus of microspore, cultured from the meiotic 2nd division for 48 hrs. on SM medium. 7. Meiotic metaphase-like nuclei of microspores, cultured from tetrad stage for 48 hrs. on ME medium.

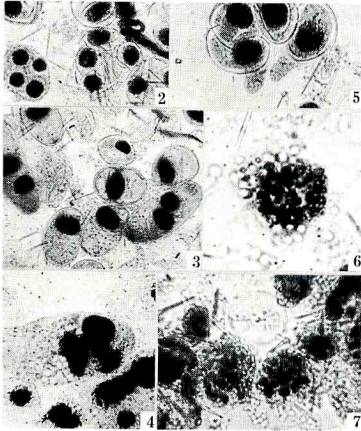


Fig 1. Pollen grain of *Gypsophila elegans*
 Pentagonal dodecahedron and dodecacolpate
 カスミソウの正12面体花粉

考 察

今までに行なわれた薬培養による花粉形成の研究のうち、最も良好な結果が得られているのは、Sparrow²⁵⁾らの行なった *Trillium* を用いた実験であって、ココナツミルクを含む培地で太糸期から小胞子核分裂まで進んだものが22%に達している。しかし引き続き成熟花粉にまで進んだものはみられていない。Taylor²⁶⁾によると *Tradescantia* の薬培養では、第1分裂中期以前から4分子期をこえて発育が進んだ例は1つもなく、4分子期から小胞子核分裂期まで進むものは僅かながらあるが、やはり成熟花粉にはならない。Vasil^{28)~30)}はおもに *Allium cepa* を用いて特に還元分裂期の発育状態を種々の培地上で調べているが、それによるとWhiteの培地にココナツミルク、カイネチン、ジベレリン、RNAまたはDNAを加えたものではないずれも細糸期~接合期から4分子期に達し、中でもカ

イネチン・ジベレリン、またはRNA含有培地が最も良好な発育を示している。しかしこれらの培地でも4分子期またはそれ以後の小胞子期から小胞子核分裂期まで進んだものではなく、RNAの4ヌクレオチッド成分を加えた培地上ではじめて2細胞花粉になることを報告している。

今回の結果でも還元分裂期から成熟花粉期まで引き続き薬の発育したものはみられなかったが、細糸期またはそれ以前よりP₁まで進んだもの、第1分裂中期よりP₆まで進んだもの、P₃またはそれ以前よりP₈に進んだものが少数ながらみられたことは、従来の結果に比べてやや良好であったといえることができよう。また、用いた培地のうちRNAまたはカイネチンを含んだものが効果的であったことはVasil²⁸⁾²⁹⁾の結果とも一致するが、さらにグルタミン酸、トリプトファンを添加したのも効果がみられることは、薬の発育とRNA、タンパク合成との関連性を暗示するように思われる。

また、今回の実験から薬培養による花粉発育過程に障害をうけやすいcritical stageが少くとも接合期~太糸期、4分子期~P₁、P₄₋₅、P₇₋₈の4期あることが示唆された。次にこれらの時期について若干の考察を試みたい。

まず、接合期~太糸期については、この時期に還元分裂前期DNAの合成がおこることが *Lilium*⁶⁾⁸⁾ *Trillium* などでは確かめられており、接合期または接合期~太糸期間にDNA合成阻害剤を与えると還元分裂に種々な障害をひきおこし、synaptenemal complexの形成も妨げられる²⁴⁾。このDNA合成にはある種のタンパク質合成が必要であり⁷⁾、また前期の始めに多量にみられる細胞質内のribosomeも接合期~太糸期間に大巾な減少がおこり¹³⁾、各種の酵素類も接合期に入ると急激に増加する²⁾¹¹⁾など、この時期の花粉母細胞内の代謝系には著しい変動がみられる。

次に4分子期より小胞子への移行に際しては、4分子子を包むカロース壁の分解や小胞子壁の形成に必要な酵素類の生成、壁物質の供給などがおこると考えられ *Tradescantia* の薬腔内のタペータム細胞質中にカラゼが生成されること¹⁵⁾や、4分子直後の小胞子内にRNAやタンパク質が急増すること⁵⁾も報告されている。

小胞子のP₄₋₅期にDNA合成がおこることは *Tradescantia* でも確かめられている¹⁸⁾²⁰⁾²³⁾²⁷⁾が、Hotta and Stern⁴⁾の *Lilium* での研究によると、小胞子内のDNA合成に先立ってまずRNAの増加がみられ、

次いでチミジン・キナーゼなどの酵素類が活性化されこれらの過程が阻害されるとDNA合成も阻害をうけ、発育が妨げられる。また、*Tradescantia* の小孢子内DNA合成直後に、小孢子核分裂に先立って、細胞質内に ribosome RNAの合成がおきることも報告されている¹⁴⁾²⁷⁾³³⁾ さきに報告した*Tradescantia* 小孢子細胞内の澱粉粒の減少¹⁷⁾や葯内アミノ酸の増加¹⁹⁾がこの時期に顕著にみられることも葯および細胞内に著しい生理的变化がおこっていることを示すものであろう。

同様にP₇₋₈期でも生殖細胞核のDNA合成²²⁾、RNAの急減³³⁾、ならびに管細胞核および細胞質内でのRNAの増加³³⁾が*Tradescantia* で報告されており、また、*Poaonia tenuifolia* ではスクレオヒストンの呈色反応は生殖核では強くなる一方管細胞核では弱まり、それとは逆に管細胞質内のRNAとタンパク質とは著しく増加することも報ぜられている²¹⁾。

このように上記の4 critical stagesはいずれも細胞内または葯腔内の代謝系に著しい変動がみられ、特に4分子期~P₁を除く他の3時期は核内のDNA合成期と一致していることは、DNA合成をひきおこすための特定の遺伝子を活性化する条件、あるいはDNA合成に先立っておこると考えられるRNAまたはタンパク質合成のための条件が培養葯内では正常に成立し難いのではなからうか。雄性不稔の*Tradescantia* 三倍体の花粉退化期がP₄₋₅、P₇₋₈と一致している¹⁸⁾こともこれと関連して考えると興味深い。また、特に4分子期以後の小孢子的発育には葯腔内のperiplasmodiumも重要な役割を演じているものと思われるがMephams and Lane¹⁵⁾ が指摘しているように、それは単なるタペータム組織の崩壊による物質の供給というよりも、さ

らに積極的な役割を果しているものと思われる。4分子期以後の花粉培養が成功しないのもこの辺に問題がありそうである。小孢子発育過程の実態を明らかにするためには、小孢子細胞内の代謝調節系、微細構造の消長などの研究を進めると同時に、それを取り囲む葯腔内条件についても更に追究することが必要であろう。

要 約

培養葯内でのムラサキツユクサの花粉の発育状態について報告した。標準培地にはTaylorのものを用い、それに数種のアミノ酸、RNA、DNA、カイネチン、酵母抽出液、麦芽抽出液等を加えた。これらのうち最も効果的であったのはRNA、グルタミン酸、トリプトファンを加えたものであったが、カイネチンを加えたものも小孢子期にはいくらか効果があった。

今回の結果では還元分裂期から2細胞花粉期まで発育したものはなかったが、細糸期から小孢子分離期まで、第1分裂中期から小孢子核分裂期まで、および小孢子中間期の中頃から2細胞花粉期まで達したものがそれぞれ少数ながらみられた。これから測定された培養葯中の花粉発育に要する時間はおよそ、還元分裂期が90時間、小孢子中間期が130時間、2細胞花粉期が70時間またはそれ以上である。

今回の研究から、培養葯の発育が障害をうけやすいcritical stageが、接合期~太糸期、4分子期~小孢子分離期、小孢子中間期のG₂後期、生殖細胞核分化初期の少くとも4期あることが示唆された。そしてこれらの時期の意義について、細胞代謝、特にDNA合成の見地から論じた。なお、培養葯中にみられたいくつかの異常現象についても述べた。

引 用 文 献

- 1) Gregory, W.C. (1940) Experimental studies on the cultivation of excised anthers in nutrient solution. Amer. J. Bot. 27:687-692.
- 2) 堀田康雄 (1971) 還元分裂, 細胞学大系5, 増殖と分化 (朝倉書店): 74-106.
- 3) Hotta, Y. and H. Stern (1963a) Inhibition of protein synthesis during meiosis and its bearing on intracellular regulation. J. Cell Biol. 16:259-279.
- 4) ---- and ---- (1963b) Molecular facets of mitotic regulation I. Synthesis of thymidine kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 49:648-654.
- 5) ---- and ---- (1963c) ----- II. Factors underlying the removal of thymidine kinase. Ibid. 49:861-865.

- 6) ----, M.Itô and H.Stern (1966) Synthesis of DNA during meiosis. *Ibid.* 56:1184-1191.
- 7) ----, L.G.Parchman and H.Stern (1968) Protein synthesis during meiosis. *Ibid.*60:575-582.
- 8) 伊藤道夫 (1968) 体細胞分裂と減数分裂の制御機構. 科学 38 : 78-84.
- 9) Itô, M., Y.Hotta and H.Stern (1967) Studies of meiosis in vitro II. Effect of inhibiting DNA svnthesis during meiotic prophase of chromosome structure and behavior. *Dev.Biol.* 6:54-77.
- 10) 木俣美樹男・阪本寧男 (1971) 薬培養によるコムギ属, エギロブス属およびカモジグサ属植物のカルス誘導と器官再分化. 日本花粉学会々誌 8 : 1-7.
- 11) Knox, R.B., H.G.Dickinson and J.Heslop-Harrison (1971) Cytoplasmic RNA and enzyme activity during the meiotic prophase in *Cosmos bipinnatus*. *Pollen development and physiology* (ed.J.Heslop-Harrison):32-35.
- 12) Lima-De-Faria,A.(1950) Meiosis and pollen mitosis in rye under controlled conditions. *Hereditas* 36:106-109.
- 13) Mackenzie,A.,J.Heslop-Harrison and H.G.Dickenson (1967) Elimination of ribosomes during meiotic prophase. *Nature (London)*215:997-999.
- 14) Mascarenhas,J.P. and E.Bell (1970) RNA synthesis during development of the male gametophyte of *Tradescantia*. *Dev.Biol.*21:475-490.
- 15) Mepham,R.H. and G.R.Lane (1969) Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*. *Protopl.*68:175-192.
- 16) Mosoes,M.J. and J.H.Taylor (1955) Desoxyypentose nucleic acid synthesis during microsporogenesis in *Tradescantia*. *Exp.Cell Res.*9:474-488.
- 17) Nakazawa,Z.(1957) Studies on pollen mitosis in relation to the pollen development I. Relation between the changes in the amout of starch grains and the mitosis during the pollen development in *Pinus* and *Tradescantia*. *Sci.Rep.Hirosaki Univ.*3:52-59.
- 18) ---- (1962) ----- II.Male sterility and exceptional pollen mitosis in triploid *Tradescantia*. *Ibid.*9:95-103.
- 19) ---- (1964) ----- III. Free amino acids in developing anthers of triploid and other *Tradescantia* plants. *Ibid.* 11:83-87.
- 20) 中沢潤・佐藤進一 (1968) 花粉形成過程におけるDNA合成について. 日本花粉学会々誌 2 : 1-5.
- 21) Sauter,J.J. and H.Marquardt (1967) Die Rolle des Nucleohistons bei der RNS-und Proteinsynthese während der Mikrosporogenese von *Paeonia tenuifolia*. *Z.Pfl.Physiol.*58:126-137.
- 22) Sato,S.(1964) Variation of deoxyibonucleic acid amount during differentiation of the nuclei of pollen in *Tradescantia*. *Sci.Rep.Hirosaki Univ.*11:35-39.
- 23) ----, Y.Kondo and Z.Nakazawa (1967) On the DNA synthesis in microspore of *Tradescantia*. *Ibid.* 14:49-52.
- 24) Sen,S.K. (1969) Chromatin organisation during and after synapsis in cultured microsporocytes of *Lilium* in presence of mitomycin C and cycloheximide. *Exp.Cell Res.*55:123-127.
- 25) Sparrow,A.H., V.Pond and S.Kojan (1955) Microsporogenesis in excised anthers of *Trillium erectum* grown in sterile media. *Amer.J.Bot.* 42:384-393.

- 26) Taylor, J.H. (1950) The duration of differentiation in excised anthers. *Ibid.* 37:137-143.
- 27) ---- (1953) Autoradiographic detection of incorporation of P^{32} into chromosomes during meiosis and mitosis. *Exp. Cell Res.* 4:164-173.
- 28) Vasil, I.K. (1957) Effect of kinetin and gibberellic acid on excised anthers of *Allium cepa*. *Phytomorphology* 7:138-149.
- 29) ---- (1959) Cultivation of excised anthers in vitro. Effect of nucleic acids. *J. Exp. Bot.* 10:399-408.
- 30) ---- (1963) Some new experiments with excised anthers. *Plant tissue and Organ culture. A symposium. India:* 230-237.
- 31) Walker, G.W.R. (1957) The effects of colchicine on microsporogenesis in cultured anthers of *Tradescantia paludosa*. *Amer. J. Bot.* 44:690-696.
- 32) ---- and J. Dietrich (1961) Kinetin-induced meiotic prophase acceleration and stasis in *Tradescantia* anthers cultured on media deficient in sugar. *Nature (London)* 192:889-890.
- 33) Woodard, J.W. (1958) Intracellular amounts of nucleic acids and protein during pollen grain growth in *Tradescantia*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:383-390.

Summary

This paper was a report of the process of pollen development in the excised anthers of *Tradescantia reflexa* cultured in vitro. The standard medium employed was Taylor's medium, and this was supplemented with a variety of elements such as amino acids, RNA, DNA, kinetin, yeast extract, malt extract, and so on (Table 1). Of the media tested, the most effective combination of elements for anther growth was the one supplemented by RNA, glutamic acid and tryptophan, while the standard medium plus kinetin was rather effective for the microspore stage (Table 4).

Among the examples obtained so far, a few anthers attained the microspore liberation stage when the culturing began at leptotene, and a few others attained the microspore mitosis stage from metaphase I stage, though no anther cultured from the meiotic stage attained the mature pollen stage (Fig. 1A). The duration of the anther development in culture media estimated from these results was roughly as follows; 90 hours from leptotene to tetrad, 130 hours from tetrad to microspore mitosis, and 70 hours or more from microspore mitosis to mature pollen stage (Fig. 1B).

From this study, it was suggested that there were at least four critical stages at which the development of excised anthers tended to be arrested. These stages are zygotene~pachytene, tetrad~microspore liberation stage, late G_1 period of microspore interphase and early differentiating 2-cell pollen stage (Tables 2, 3). The significance of these critical stages was discussed from a viewpoint of cell metabolism, especially the DNA synthesis. In addition, some abnormal phenomena of the pollen development found in culture were described (Figs. 2-7).